

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局(43) 国际公布日:
2003年1月16日(16.01.03)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 03/04648 A1

(51) 国际分类号: C12N 15/13, 15/62, C12P 21/08

中国北京市安外大电路917大楼遗传所, Beijing 100101 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN02/00347

(22) 国际申请日: 2002年5月23日(23.05.02)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
01118247.4 2001年5月24日(24.05.01) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国):中国科学院遗传与发育生物学研究所(INSTITUTE OF GENETICS AND DEVEL. BIOL., CAS) [CN/CN];中国北京市安外大电路917大楼, Beijing 100101 (CN)。北京安波特基因工程技术有限公司(BEIJING ABT GENETIC ENGINEERING TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN];中国北京市安外大电路917大楼遗传所内, Beijing 100101 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国):黄华樑(HUANG, Hualiang) [CN/CN];蒋欣(JIANG, Xin) [CN/CN];方敏(FANG, Min) [CN/CN];中国北京市安外大电路917大楼遗传所, Beijing 100101 (CN)。冯捷(FENG, Jie) [CN/CN];周萍(ZHOU, Ping) [CN/CN];中国北京市人民医院, Beijing 100044 (CN)。余小淙(YU, Xiaocong) [CN/CN];林晴(LIN, Qing) [CN/CN];

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司(CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD);中国北京市海淀区海淀路80号中科大厦16层, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: ANTI HUMAN OVARIAN CANCER -ANTI CD3 BISPECIFIC ANTIBODY

(54) 发明名称: 抗人卵巢癌抗人CD3双特异性抗体

(57) Abstract: The invention provides an anti-ovarian cancer bispecific antibody, said antibody includes two polypeptide domains connected by a polypeptide linker, one is anti- ovarian cancer antibody, or its Fab fragment, single complementarity determining region(CDR) antibody or single chain Fv (scFv), the other is anti-CD3 antibody, or its Fab fragment, single CDR antibody, or scFv. The invention also provides DNA sequences encoding said antibody, an expression vector containing said DNA sequence, and an host cell containing said expression vector.

(57) 摘要

本发明提供了一种抗卵巢癌的双特异性抗体, 它是由抗卵巢癌的抗体, 或其 Fab 片段、单域抗体或单链抗体; 和抗人 CD3 的抗体, 或其 Fab 片段、单域抗体或单链抗体连接而成的。本发明还提供了编码这种抗体的 DNA 序列, 含有这种 DNA 序列的表达载体和含有这种表达载体的宿主细胞。



抗人卵巢癌抗人 CD3 双特异性抗体

5 技术领域

本发明涉及抗癌基因工程双特异性抗体，表达该双特异性抗体的核苷酸序列，含有该核苷酸序列的载体，含有该载体的宿主细胞。

背景技术

10 双特异性抗体(BsAb), 为非天然抗体, 其两个抗原结合部位具有不同的特异性, 因此, 化学结构上是双价的, 结合抗原的功能是单价的。将肿瘤相关抗原特异的抗体与具杀伤肿瘤细胞功能的效应细胞的表面触发分子特异的抗体偶联构成的双特异性抗体, 可高效地将体内的免疫效应细胞富集于肿瘤细胞周围, 激活免疫效应细胞特异性地杀伤肿瘤细胞, 从而起到治疗肿瘤的目的。目前双特异性抗体的制备有化学偶联法, 杂交瘤法和基因工程法三种。化学偶联法是先采用还原剂, 使不同的两种单克隆抗体或其片段解链, 获得单价抗体或抗体片段, 再采用异双功能交联剂把两种具有不同抗原特异性的单价抗体或其片段交联在一起。该方法可快速, 大量制备BsAb, 但是在交联过程中抗体时有失活, 而且难于保证产物的均质性。杂交瘤法是通过细胞融合的方法, 将分泌其中一种单克隆抗体的杂交瘤细胞与经另一种抗原免疫的脾细胞融合, 或两种分泌不同单克隆抗体的杂交瘤细胞彼此融合。融合而成的细胞, 前者称三细胞瘤, 后者称四细胞瘤, 两者统称二次杂交瘤。杂交瘤方法制备的BsAb生物活性高, 但制备繁琐, 耗时长, 且不易与同时产生的其他没有活性或不需要的抗体分离。此外, 人源杂交瘤技术尚未取得突破性进展, 该法获得的BsAb在临床应用上面临产生人抗鼠抗体(HAMA)问题和分子量过大的问题, 且用该方法制备临床级的BsAb成本很高, 难以普及使用。基因工程法制备BsAb是随着基因工程抗体技术的发展, 在小分子抗体的基础上发展起来的, 有其明显的优越性, 如方法稳定, 可大量生产, 且成本大大降低, 操作简便等, 正逐步取代化学偶联法和二次杂交法。随着基因工程技术的成熟, 用不同的方法可将两种不同的单链抗体(ScFv)连接构成小分子的 BsAb。根据连接方法不同有三种BsAb的构成形式。(1) Mini-
25 antibody: 利用一个寡聚化的结构域(例如, Fos或Jun亮氨酸拉链)将两个ScFv组
30

装成一个异二聚体的分子。(2) Diabodies: 将两个不同抗体的 V_H 和 V_L 用一个短的连接肽(例如, Gly₄Ser)连接成两条不同的单链: $V_{H1}-V_{L2}$ 和 $V_{H2}-V_{L1}$, 在同一个细胞中共表达, 由于短的连接肽使得同一条链的 V_H 和 V_L 难以配对, 而仅与另外一条链的、但实际上却是来源相同的V区相匹配, 折叠形成一个具有两个抗原结合位点的二聚体分子。(3) ScBsAb: 在同一个载体上将两种特异性的scFv 用一个域间连接肽(interlinker)相连构成, 其中构成两个scFv的链内连接肽(intralinker)常用的是 (Gly₄Ser)₃, 而连接两个scFv 的域间连接肽有两种设计, 一种为短的肽链, 一般不超过10个氨基酸残基, 常用的是Gly₄Ser, 这种设计主要目的是防止异源可变区之间的错配。另一种设计方案为长的肽链, 本实验室在采用 Gruber在构建抗TCR×抗荧光的scBsAb中设计了一个长25aa的域间连接肽 205c' 的同时, 也分别设计了经改造的长26aa的Fc片段和长25aa的HSA 片段作为域间连接肽, 结果均显示其同样可使两个scFv产生正确的蛋白折叠而形成两个具有较强抗原结合活性位点的BsAb。域间连接肽设计总的原则是保证抗体可变区结构域发生正确的配对和折叠并保持其生物学活性及稳定性, 其次还可根据需要赋予产物一些新的特性, 如便于纯化、延长其在体内的半衰期等。

双特异抗体介导的生物免疫导向治疗在肿瘤的生物治疗中有良好的临床应用前景。其特征在于: 其一, 双特异抗体介导的对肿瘤细胞的杀伤作用是靠激发机体的免疫系统完成的, 免疫效应细胞对肿瘤细胞的杀伤是高度肿瘤特异性的, 且不受MHC的限制。其二, 双特异抗体对正常组织是无害的。因此, 应用双特异抗体治疗肿瘤是手术, 放疗, 化疗等传统方法的补充, 其真正作用在于消除亚临床病灶, 减少乃至消灭肿瘤的复发和转移。表现为既可以根治肿瘤, 又可以激发机体产生和维持较长时间的免疫保护作用。综合小鼠及临床研究结果, 制备用于肿瘤治疗的临床级BsAb至少必须具备5种特性: ①对靶向的肿瘤抗原具有很高的特异性和亲和力; ②可单价结合效应细胞表面的细胞毒效应触发分子, 并只在遭遇了肿瘤抗原后发生交联, 它们不含有Fc段; ③可有效地启动高水平的靶向性细胞毒作用以及相应的白细胞群有选择性地对肿瘤局部产生炎症反应; ④必须人源化, 降低重复使用后发生的HAMA反应; ⑤BsAb应小到足以渗透入肿瘤但又应大到足以在循环中维持足够的时间。

以上述几点为依据, 目前, 人们开发研究了多种激发不同免疫效应细胞, 针对不同肿瘤细胞的双特异性抗体, 其中的免疫效应细胞包括T淋巴细胞、NK细胞、单核

巨噬细胞、中性粒细胞以及LAK细胞（淋巴因子激活的杀伤细胞）和TIL细胞（激活的肿瘤浸润性淋巴细胞）等。T淋巴细胞是特异性细胞免疫应答的主要细胞，是目前研究得最多的效应细胞。CD3分子表达于所有成熟T细胞表面，是所有T细胞表面共同的表面标志。CD3与TCR呈非共价结合，形成完整的TCR-CD3复合物，共同参与对抗原刺激的免疫应答，是目前在双特异性抗体中应用最多且最成功的免疫效应细胞表面的触发分子。BsAb中的抗CD3抗体与T细胞表面的CD3分子结合后，可产生多种效应功能，实现对肿瘤细胞的杀伤。这些效应功能包括（1）T细胞增殖分化：BsAb首先可活化静止型T细胞，CD4⁺、CD8⁺的前体效应T细胞激活成为Th细胞和Tc细胞；其次活化大量记忆细胞，增殖和分化成为效应性T细胞，对肿瘤细胞进行攻击和杀伤。效应细胞的数量直接与肿瘤消退的速度有关。（2）细胞因子分泌：经BsAb活化的CD4⁺Th细胞可大量分泌IL-2，IL-2一方面以自分泌方式刺激Th细胞的分裂增殖，另一方面以旁分泌方式激活CD8⁺前体细胞活化为Tc，起到放大杀伤性T细胞的细胞毒作用。此外，IL-2又是活化T细胞的共刺激信号。因此，IL-2在BsAb介导的免疫效应中占有重要的地位。T细胞活化过程中还可释放TNF- α 和IFN- γ ，它们可相互诱生并活化其它效应细胞，还可通过细胞间介质抑制旁观肿瘤细胞生长、产生旁观者效应。（3）细胞毒作用：体外研究显示在BsAb的作用下，CD8⁺Tc细胞与肿瘤细胞直接接触，通过排粒作用释放细胞毒性物质，可溶解靶细胞，其作用迅速，通常发生于着靶后4~6hr内。细胞毒性物质主要是穿孔素(perforin)和丝氨酸酯酶或称颗粒酶(granzyme)。穿孔素可攻击胞膜而形成离子通道，使大量离子和水进入，导致细胞溶解坏死，而颗粒酶类似于淋巴毒素，可以活化靶细胞内的DNA酶，导致核DNA的裂解，引起靶细胞的凋亡。

目前，构建BsAb时所用的抗体一般为Fv片段，这是因为Fv片段是含有完整抗原结合位点的最小单位，分子小（只有完整抗体的1/6），不含Fc段，免疫原性低，易于穿过血管壁和进入实体瘤，而且还可以用大肠杆菌表达，发酵生产，大大地降低了生产成本，但由于Fv中V_H和V_L间不能形成共价键，在体内不稳定，很容易解离。为了提高Fv片段的稳定性，在V_H和V_L间用一条多肽链即连接肽把它们连接起来形成所谓的单链抗体(ScFv)。连接肽通常为一条长15个氨基酸的具有柔韧性的短肽，常用的是(Glg₄Ser)₃。在本发明中，两种ScFv都采用此连接肽。如上所述，将两种不同的ScFv连接构成小分子的BsAb有几种方法，本发明采用的是，用一个域间连接肽将两个ScFv连接起来构成单链双特异抗体(ScBsAb)。设计域间连接肽时，总的原则是

保证两种抗体的可变区结构域分别正确地配对和折叠并保持其生物学活性及稳定性，其次还可根据需要赋予产物一些新的特性，如便于纯化、延长其在体内的半寿期等。本发明所独创设计的两种域间连接肽Fc和HSA对此进行了有益的尝试和探索，为域间连接肽的设计提供了新的思路，同时，为了比较和验证本发明所设计的域间连接肽的效能以及该设计在抗人卵巢癌特异性BsAb中的利用价值，也采用了文献报道的一种205c'作为一种域间连接肽。

(1) Fc 域间连接肽的设计：为了减小免疫原性和分子大小，小分子抗体中不带有抗体的Fc区段，因此，缺乏Fc段所介导的ADCC，CDC以及激活补体的经典途径等生物功能。为此我们尝试通过域间连接肽的设计来弥补基因工程抗体的这一缺陷。在IgG的四种亚型中，以IgG1引发ADCC和CDC的能力最强，通过其CH₂的C端一段序列与C1q结合，引发补体的经典激活途径，其中Gly318，Lys320和Lys322在空间构象上最近成簇，位于Fc分子表面，直接与C1q结合。此外，在CH₂的Asn297上存在一个IgG的糖基化位点对Fc引发的ADCC和CDC至关重要。由此，本发明选择了人IgG的CH₂中297-322的一个片段用于构造ScBsA的域间连接肽，该肽段长26aa，包含了糖基化位点Asn297，C1q结合位点Glu318，Lys320和Lys322等，以及为便于克隆，在5'端和3'端分别加上的EcoR I 和Sac I 酶切位点，期望由此构建的ScBsAb具有延长体内半寿期和类似Fc引发CDC效应的功能。

(2) HSA 域间连接肽：小分子抗体由于分子量小极易经肾脏过滤而被清除，因此，在体内的半寿期短这虽有利于肿瘤的免疫显像诊断，但在免疫治疗中由于滞留时间短。而难以达到理想的治疗效果，由此，本发明期望通过域间连接肽的设计来延长ScBsAb在体内的半寿期，增强其稳定性和可溶性。HSA（人血清白蛋白）是人血清中的重要成分，性质稳定，半寿期可长达数周，本身不具有特异的酶学和免疫学活性，可经肝脏缓慢清除，因此，作为一种稳定的天然载体已得到了广泛的应用。研究表明，与HSA偶连的目的蛋白在动物体内的稳定性增加了20-40倍。HSA分子全长585aa，由三个结构域组成，其中第三个结构域DIII单独使用就具有HSA完整分子的载体功能，鉴于此，本发明采用HSA的DIII中不含cys且极性氨基酸较多的403-427长25个氨基酸的片段作为构建ScBsAB的另外一种域间连接肽，以提高产物的稳定性及在体内的半寿期。

(3) 205c' 域间连接肽：Gruber等人在构建抗TCR×抗荧光素ScBsAb中采用的一个长25aa的域间连接肽。引用它作为第三种域间连接肽的目的是为了比较和验证本发明所设计的域间连接肽的效果以及该设计在抗人卵巢癌特异性BsAb中的利用价值。

由于鼠源抗体在临床应用中所遇到的HAMA问题，严重限制了抗体的使用次数和使用剂量，影响了疗效，因此，降低抗体的异源性，对其进行人源化改造是制备临床使用抗体的当务之急，本发明的ScBsAB中的抗CD3的ScFv即是经过人源化改造后的改形抗体。改形抗体又称为CDR移植抗体或人源化抗体，是将小鼠抗体的可变区的互补性决定区（CDRs）移植到人源抗体的骨架区（FR）而成。抗体的抗原结合部位空间结构主要是由可变区的六个CDRs决定。它们形成三个环型结构在抗原抗体的识别中起决定作用，并由四个 β 片层结构的FR区支撑于可变区的顶端。这种抗体在保留与抗原结合的同时又保留了人源抗体的大部分特征，极大限度地减少了HAMA。

卵巢癌死亡率居妇科恶性肿瘤之首位，五年存活率仅在30%，虽手术方法不断改进，化疗药物不断更新，放疗措施逐步完善，其预后仍未从根本上改观，主要原因在于卵巢癌深居盆腔，起病隐匿，临床发现多属晚期，且术后易复发，反复化疗常产生毒副作用及耐药性，严重影响了治疗效果。因此，特异的早期诊断方法和残余病灶的及时清除是改善预后的关键环节。对卵巢癌细胞相关抗原特异的BsAb在临床上有着广阔的应用前景。

发明概述

本发明的目的就是用基因工程技术开发一种低毒，高效，价廉的卵巢癌的生物治疗制剂——抗人卵巢癌 \times 抗人CD3双特异性抗体。

本发明的另一个目的是提供一种编码所述的BsAb的核苷酸序列。

本发明的又一个目的是提供一种所述的核苷酸序列的载体。

本发明的再一个目的是提供一种用本发明的表达载体转化的宿主细胞。

另外，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本发明的其它方面对本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

附图简要说明

图 1.质粒 pFUW80 的物理图

图 2.抗卵巢癌单克隆抗体重链和轻链可变区基因的核苷酸序列及所编码的氨基酸序列

图 3. ELISA 法检测抗卵巢癌 scFv 活性

图 4.质粒 pROH80 的物理图

图 5.抗 CD3 改形单链抗体的重链和轻链可变区基因的核苷酸序列及所编码的氨基酸序列

图 6. FACS 法测定抗 CD3 改形 scFv 的抗原结合活性

图 7.质粒 pAL-781 的物理图及合成的多克隆位点

5 图 8.三种 interlinker 的核苷酸序列及所编码的氨基酸序列

图 9.质粒 pALM 的物理图

图 10.质粒 pET△E 的物理图

图 11.质粒 pTMF 的物理图

图 12. ELISA 法检测 BsAb 的抗卵巢癌活性

10 图 13.双特异性抗体在 pTMF 中表达的 SDS-PAGE 电泳结果

发明详述

抗体分子具有两条相同的重链和轻链，每一条链由一个可变区(variable region)和一个或多个恒定区(constant region)组成，可变区主要负责与抗原结合，恒定区主要
15 主要负责结合效应分子。在每一个可变区内有三个在序列和晶体结构上都高度变化的柔性环区(loop)，它们主要负责抗原的识别，被称为互补决定区(complementarity-determining regions, CDRs)，而可变区的其余部分相对稳定，由较为刚性的 β -折叠 (β -sheet) 组成，支撑着，被称为框架区(framework regions, FRs)，CDRs 与 FRs 间隔排列而形成“三明治”结构。在本发明中，所使用的一些术语具有如下的含义：

20 “Fab 抗体”是指由 Fd 段（重链 V_H +CH1 构成）和完整的轻链组成，二者通过一个链间二硫键连接，形成异二聚体，它是完整抗体分子的三分之一，仅有一个抗原结合位点。

“单链抗体（scFv）”是用基因工程构建的一种抗体片段，由抗体重链可变区（ V_H ）和轻链可变区（ V_L ）通过一连接肽连接而成的重组蛋白，约为完整抗体分子的
25 六分之一。

“单域抗体”是由抗体重链可变区（ V_H ）或轻链可变区（ V_L ）构成，这种抗体只有一个结构域构成，故称为单域抗体，它是完整抗体分子的十二分之一。

“最小识别单位（Minimal recognizing unit, MRU）”是由单个 CDR 构成，约为完整抗体分子的七十分之一或八十分之一。

“改形抗体(Reshaping antibody)”也叫做CDR移植抗体(CDR-grafted antibody)。用基因合成或定点突变的方法将鼠源CDRs置换人源抗体中的CDRs，从而保留鼠源抗体的抗原结合特异性。但在构建时要考虑人源FRs中某些氨基酸残基会影响鼠源CDRs构成的抗原结合部位的构象，因此需对FRs中个别氨基酸残基进行突变，才能
5 获得既具有高亲和力又最大程度上达到人源化的抗体。

本发明提供了一种抗卵巢癌基因工程双特异抗体。其抗体部分可以是完整的抗体分子，Fab，单域抗体或单链抗体(ScFv)。

抗卵巢癌基因工程双特异抗体最好是由两个不同的单链抗体构成。

本发明的抗卵巢癌基因工程双特异抗体最好是由抗卵巢癌的单链抗体和抗人
10 CD3改形单链抗体构成的杂合蛋白。它是由抗卵巢癌的单链抗体和抗人CD3改形单链抗体通过三种不同的链间连接肽连接起来后在宿主中表达的产物，它能激活T淋巴细胞特异性地杀伤卵巢癌细胞。

本发明的双特异性抗体中，所述的抗卵巢癌的单链抗体可以具有如下的重链可变区氨基酸序列：

15

1 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu

11 Val Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile

20

21 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

31 Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met

41 Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Leu Gly Trp

25

51 Ile Asn Thr Asn Ser Glu Val Pro Lys Tyr

61 Ala Glu Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe

30

71 Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

81 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp

91 Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ala Arg Ser Phe

5

101 Thr Trp Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln

111 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

10 本发明的双特异性抗体中，所述的抗卵巢癌的单链抗体可以具有如下的轻链可变区氨基酸序列：

1 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser

15 11 Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser

21 Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val

31 His Ser Ile Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp

20

41 Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys

51 Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

25 61 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

71 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

81 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val

30

91 Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro
101 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
5 111 Leu Lys

本发明的双特异性抗体中，所述的抗人 CD3 的改形单链抗体可以具有如下的重链可变区氨基酸序列：

10 1 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
11 Val Arg Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val
21 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
15 31 Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala
41 Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
20 51 Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
61 Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met
71 Thr Thr Asp Lys Ser Phe Ser Thr Ala Ile
25 81 Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
91 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
30 101 Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly

111 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

本发明的双特异性抗体中，所述的抗人 CD3 的改形单链抗体可以具有如下的轻
5 链可变区氨基酸序列：

1 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr
11 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
10 21 Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
31 Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
15 41 Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
51 Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
61 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
20 71 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
81 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
25 91 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
101 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

本发明的双特异性抗体中，连接两个单链抗体的域间连接肽可以具有如下的氨
30 基酸序列：

1 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

11 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

5

21 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

本发明的双特异性抗体中，连接两个单链抗体的域间连接肽可以具有如下的氨基酸序列：

10

1 Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

11 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr

15

21 Leu Val Glu Val Ser

本发明的双特异性抗体中，连接两个单链抗体的域间连接肽可以具有如下的氨基酸序列：

20

1 Ala Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala

11 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp

21 Ala Lys Lys Asp Leu

25

本发明还提供了一种编码所述双特异性抗体的核苷酸序列。其中包括两种单链抗体基因和两种单链抗体基因之间的域间连接肽的核苷酸序列，该连接肽可以是任何一种使两种单链抗体保持各自的抗体结构域的折叠和生物学活性，并能够赋予产物一些新的特性，但最好使用本发明设计构建的 Fc 域间连接肽和 HSA 域间连接肽或本发明所引用的 205c' 域间连接肽。

30

本发明提供了可用于构建和表达双特异性抗体的通用的大肠杆菌质粒及含有编码本发明的双特异性抗体的核苷酸序列的表达载体。在本发明的优化实施方案中，一种质粒为pALM，它是以pAL781为背景质粒构建而成的通用的双特异性抗体表达质粒。该质粒具备如下特点：在已构建好的双特异性抗体基础上，置换任何一种单链抗体基因，就可以获得不同类型的双特异抗体。含有编码本发明的双特异抗体核苷酸序列的pALM命名为pAMAB。另一种质粒为pET Δ E，是由pET16失活EcoRI位点得到的，它含有lac操纵子和T7启动子，是一种高效表达目的蛋白的载体。含有编码本发明双特异抗体核苷酸序列的pET Δ E命名为pEMAB。另一种质粒为pTMF，它是以pET28a为背景质粒，根据双特异抗体的酶切位点和进一步研究的需要，构建而成的不局限于双特异抗体的高效表达质粒。该质粒除了具高效表达的特点外，还具备如下特点：具有多种较稀少的酶切位点，便于插入各种外源基因使它们或共表达或成融合表达；在两组酶切位点之间有一凝血酶的酶切位点，可将表达的融合蛋白纯化后分开；在多克隆位点的3'端有编码六个组氨酸的密码子，便于表达产物作金属螯合层析纯化。含有编码本发明双特异抗体核苷酸序列的pTMF命名为pTMAB。

15 本发明还提供了含有上述表达载体的宿主细胞。所述的宿主细胞最好是大肠杆菌。

本发明基因工程双特异抗体可通过以下步骤生产：

1. 设计适当的引物，从分泌抗肿瘤单克隆抗体的杂交瘤细胞株中分别扩增和克隆出单克隆抗体的重链和轻链可变区基因；
- 20 2. 将得到的抗肿瘤的重链和轻链可变区基因插入到通用的单链抗体表达质粒，构建成单链抗体，转化大肠杆菌，诱导表达进行鉴定。
3. 根据鼠源抗人CD3单克隆抗体OKT3的抗原结合位点进行分子模拟和改形设计，分别得到改形CD3的重链和轻链可变区的氨基酸序列，参照大肠杆菌常用密码子，得到其核苷酸序列，分别化学合成重链和轻链可变区的基因片段，通过重叠PCR
25 扩增出完整的重链和轻链可变区基因。
4. 将得到的抗人CD3的改形重链和轻链可变区基因插入到通用的单链抗体表达质粒，构建成单链抗体，转化大肠杆菌，诱导表达进行鉴定。
5. 选用一种带有强启动子的质粒为背景质粒，选择在该质粒，两种ScFv，三种域间连接肽都没有的酶切位点，设计合成含有这些酶切位点的DNA片段，取代背景

质粒中的多克隆位点，并在相应的酶切位点间分别插入合成好的域间连接肽寡聚核苷酸序列，构建成通用的含域间连接肽的双特异抗体中间载体。

6. 设计合成一对引物，用PCR方法从改形CD3单链抗体表达质粒中扩增出带有合适酶切位点的单链抗体基因，把此基因插入到双特异抗体中间载体，构成抗人CD3-based ScBsAb通用表达载体。转化大肠杆菌，诱导表达，鉴定不同域间连接肽对单链抗体表达的影响。

7. 从带有抗人肿瘤单链抗体基因的表达载体中，双酶切下抗人肿瘤单链抗体基因，把此基因插入到已构成的抗人CD3-based ScBsAb通用表达载体中的相应酶切位点即构建成双特异性抗体表达载体。

8. 用此表达载体转化大肠杆菌，诱导双特异抗体表达，用SDS-PAGE鉴定表达产物的分子量，表达量和表达形式，用ELISA检测表达产物的抗肿瘤抗体活性，用FACS法检测表达产物的抗人CD3抗体活性，用Jurkat细胞或人外周血淋巴细胞来检测表达产物介导的对肿瘤细胞的杀伤能力和杀伤特异性。

9. 构建高效表达的表达载体，将双特异抗体基因插入该载体，构建出高效的表达质粒。

10. 用构建的高效表达质粒转化宿主细胞。

11. 培养转化的宿主细胞，诱导使其表达所述的双特异抗体。

12. 分离表达的双特异抗体。

另外，本发明还涉及包括本发明的抗人卵巢癌抗人 CD3 双特异性抗体和药用载体的治疗或预防肿瘤的药物组合物，和本发明的抗人卵巢癌抗人 CD3 双特异性抗体在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途及其在治疗或预防肿瘤中的用途。

下面结合具体实施例，进一步阐明本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

25 实施例：

(一)抗卵巢癌单链抗体和抗人 CD3 单链抗体的构建：

(1) 抗卵巢癌单链抗体的构建：

选用根据小鼠免疫球蛋白 FR1 区和 FR4 区设计的引物，利用 RT-PCR 和 PCR 技术分别克隆了抗人卵巢癌单抗.COC183B2 的重链可变区基因和轻链可变区基因(附图2)，平端克隆到质粒 pUC19，测序验证确为抗体可变区基因后，用相应的限制酶切

下这两个基因，插入到本实验室构建的单链抗体表达质粒 pFUW80(附图 1)中，VH 在 5' 端，VL 在 3' 端，两者之间的 Linker 为 (Gly₄Ser)₃，转化大肠杆菌菌株 Top10，挑取转化子，用酶切鉴定，确证已构建成单链抗体基因，该质粒命名为 pFVB2，用阳性质粒转化大肠杆菌菌株 XL1-blue，经辅助噬菌体 M13K07 援救，表
5 达出噬菌体单链抗体，用间接 ELISA 方法测定单链抗体活性。结果(附图 3)见待测值高于阴性对照 2.5 倍，说明抗卵巢癌单链抗体已构建和表达成功。

(2) 抗人 CD3 改形单链抗体的构建：

根据鼠源抗人 CD3 单克隆抗体 OKT3 的抗原结合位点进行分子模拟和改型设计，
10 分别得到改形 CD3 的重链和轻链可变区的氨基酸序列，参照大肠杆菌常用密码子，得到其核苷酸序列，分别化学合成重链和轻链可变区的基因片段，通过重叠 PCR 扩增出完整的重链和轻链可变区基因(附图 5)。将得到的抗人 CD3 的改形后的重链和轻链可变区基因插入到通用的单链抗体表达质粒 pROH80(附图 4)中，VL 在 5' 端，VH 在 3' 端，两者之间的 Linker 为 (Gly₄Ser)₃，转化大肠杆菌菌株 Top10，挑取转
15 化子，用酶切鉴定，确证已构建成单链抗体基因，该质粒命名为 pROCD3。挑取转化子的单菌落于含相应抗性的 LB 培养基中，37℃培养过夜，按 1-5%转接于新鲜培养基中，37℃摇至 OD₅₅₀ 为 0.5-1.0，加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG 诱导，使表达目的蛋白。用 FACS 法测定 CD3 改形单链抗体活性，结果测得 CD3 改形单链抗体对 CD3 单克隆抗体的竞争抑制率为 18%(附图 6)，说明抗人 CD3 改形单链抗体已构建和
20 表达成功。

(二) 抗人卵巢癌×抗人 CD3 双特异性抗体的构建和表达：

(1) 双特异性抗体中间载体的构建：

为了便于两个单链抗体和域间连接肽的插入，需构建一个具有适当酶切位点的表达
25 载体，选择不含目的蛋白基因的 pAL-781(附图7)作为构建双特异性抗体的初始载体。本发明设计并合成了一段长约55bp的片段，替换pAL-781原有的多克隆位点(MCS)，构建了中间载体pALM。新的MCS中包括起始密码子ATG(包括在Nde I 酶切位点中)；抗卵巢癌单链抗体插入位点Xho I -EcoR I；域间连接肽插入位点EcoR I -Sac I；抗CD3改形单链抗体插入位点Sac I -BamH I；编码6个His的
30 (CATCAC)₃片段及终止密码子TAA。对其中的元件都可以通过酶切随意置换。将合

成并纯化的三种域间连接肽片段(附图8)插入到pALM中相应的酶切位点中,经酶切及测序验证,已构建成含不同域间连接肽的ScBsAb中间载体: pALM-Fc; pALM-HSA; pALM-205c' (附图9)。

5 (2) CD3-based ScBsAb通用表达载体的构建:

设计合成一对引物,用PCR方法从改形CD3单链抗体表达质粒中扩增出带有5' Sac I 酶切位点和3' BamH I 酶切位点的单链抗体基因,把此基因插入到双特异性抗体中间载体,构成抗人CD3-based ScBsAb通用表达载体。转化大肠杆菌菌株 GI724,诱导表达,鉴定不同域间连接肽对单链抗体表达的影响。结果表明三种域间
10 连接肽对单链抗体的表达均无影响。

(3) 双特异性抗体的构建:

从带有抗人卵巢癌单链抗体基因的表达载体中,Xho I -EcoR I 双酶切下抗人卵巢癌单链抗体基因,把此基因插入到已构成的抗人CD3-based ScBsAb通用表达载体
15 中的相应酶切位点即构建成双特异性抗体表达载体。转化大肠杆菌菌株GI724,获得了转化株,并通过了酶切鉴定,从而构建完成了抗卵巢癌的双特异性抗体的表达质粒。该质粒命名为pAMAB。

(4) 双特异性抗体在大肠杆菌中的表达:

20 将含有pAMAB的GI724单菌落接种到RM培养基中,30 °C培养过夜,再按20%浓度转接到新鲜的培养基中,继续培养至OD₅₅₀为0.5-1.0,加入终浓度为100ug/ml的色氨酸,继续培养3小时,收集菌液,离心(3000rpm,10min,4 °C),弃上清,菌体重悬于1/2体积的PBS中,冰浴超声(20S,间隔1min,共6-8次),4 °C离心,12000rpm,20min,保留上清,沉淀重悬于等体积的PBS中,超声后的全菌,上清,沉淀跑12% SDS-PAGE,检测目的蛋白的表达情况,以空载体pALM为空对照,在分子量约52Kda处有一明显的表
25 达带,上清液的相应位置也有同样的表达带,说明有一部分表达产物是以可溶形式表达的,因此,可以直接用上清液鉴定双特异性抗体的生物活性。

(三) 抗人卵巢癌×抗人CD3双特异性抗体生物活性的鉴定:

30 (1) 抗人卵巢癌单链抗体的抗原结合活性:

用直接ELISA测定双特异性抗体中抗卵巢癌单链抗体的抗原结合活性。用双特异性抗体包被ELISA板，阳性对照用抗卵巢癌单克隆抗体包被，4℃包被过夜，用PBST（PBS-Tween）洗板三次，每次浸润5分钟，每孔都加入用3%羊血清稀释好的HRP-OC183B₂抗原，使抗原抗体结合，37℃保温1小时，PBST洗板三次，加入HRP底物，室温下避光显色20分钟，加入2M H₂SO₄终止反应，在酶标仪上测OD₄₉₂的读数。结果表明（附图12），双特异性抗体待测值均高于阴性对照2.5倍以上，且有梯度变化，表明双特异性抗体中抗卵巢癌单链抗体具有与卵巢癌相关抗原结合的能力。

（2）抗人CD3改形单链抗体的抗原结合活性：

利用竞争抑制的原理，用FACS测双特异性抗体中抗人CD3改形单链抗体的抗原结合活性。在FACS管中，每管加入新鲜的Jurkat细胞1×10⁶个，用含2%小牛血清和0.1% NaN₃的PBS洗细胞三次，加入双特异性抗体样品，阳性对照中加入PBS，4℃保温45分钟，用含2%小牛血清和0.1% NaN₃的PBS洗细胞三次，加入适当稀释的CD3鼠源单抗，4℃保温30分钟，用含2%小牛血清和0.1% NaN₃的PBS洗细胞三次，加入羊抗小鼠IgG-FITC（1：50），4℃避光保温45分钟，用含2%小牛血清和0.1% NaN₃的PBS洗细胞两次，细胞沉淀重悬于500u1的PBS中，在FACSort上进行测定。结果表明，双特异性抗体能够显著抑制CD3鼠源单抗的抗原结合活性，抑制率为18%，证明双特异性抗体中的CD3改形单链抗体具有与相应抗原结合的能力。因此，本发明所构建的三种不同域间连接肽的双特异性抗体中两个单链抗体都保持了与相应抗原的结合能力。

（3）抗卵巢癌双特异性抗体对卵巢癌细胞的杀伤活性：

将卵巢癌细胞株SKOV3细胞（靶细胞）接种于96孔细胞培养板，每孔100u1（约1×10⁴个细胞），双特异性抗体包涵体复性样品按三种不同量5u1，10u1，20u1加样，在CO₂孵箱中过夜，按不同效靶比加入Jurkat细胞（效应细胞），37℃，CO₂孵箱培养48小时，每孔加入25u1 MTT，再于37℃，CO₂孵箱培养4小时，倒掉孔内液体，每孔加入100u1酸性SDS（0.1N HCl, 1% SDS），37℃，孵育过夜，用酶标仪测OD₅₇₀。按如下公式计算细胞杀伤率。

$$\text{肿瘤细胞杀伤率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{E+T}} - \text{OD}_{\text{E}}}{\text{OD}_{\text{T}}} \right) \times 100\%$$

如下表1所示，加双特异性抗体后，效应细胞对靶细胞的杀伤率提高，且随双特异性抗体量的增加杀伤率也提高，说明双特异性抗体能够引导效应细胞对靶细胞的定向杀伤。

表 1

杀伤率 (%) 效靶比	BsAb 140ug/ml				
		0 ul	5 ul	10 ul	20 ul
12.5:1		97.39	100.00	110.76	144.64
6.2:1		69.56	55.09	113.27	104.29
3.1:1		33.48	46.30	52.02	64.38

5

(四) 高效表达质粒的构建与表达：

由于pALM的表达量不高，不适用于生产，需构建一个高效表达双特异性抗体的质粒。以具有T7启动子的pET16失活EcoR I 位点得到的pET Δ E(附图10)，是一个高效的表达载体，用Xho I -BamH I 从pAMAB中切下双特异性抗体的基因，插入到经同样双酶切的pET Δ E中即构成pEMAB，转化大肠杆菌BL21，诱导使其高表达目的蛋白。但由于在pET Δ E中目的蛋白与 (His)₁₀融合表达，而 (His)₁₀用IMAC (固定金属螯合层析) 的纯化效率不如 (His)₆，故而，又以pET28a为背景质粒构建了质粒pTMF(附图11)，该质粒具有T7启动子，可高效表达目的蛋白，同时，具有多种较稀少的酶切位点，便于插入各种外源基因使它们或共表达或成融合表达；在两组酶切位点之间有一凝血酶的酶切位点，可将表达的融合蛋白纯化后分开；在多克隆位点的3' 端有编码六个组氨酸的密码子，便于表达产物作金属螯合层析纯化。

用Xho I -BamH I 从pAMAB中切下双特异性抗体的基因，插入到经同样双酶切的pTMF中即构成pTMAB，转化大肠杆菌BL21，经筛选和酶切鉴定后，挑选单克隆，培养至OD₅₅₀为0.5，加入终浓度为0.4mM的IPTG诱导目的蛋白表达，3小时后收菌，超声破菌，跑SDS-PAGE电泳(附图13)。双特异性抗体的表达量占菌体总蛋白的27%，其中以可溶形式表达的双特异性抗体占可溶性蛋白的16%，这一表达量已能用于生产。

(五) 结论:

所构建的抗人卵巢癌×抗人 CD3 双特异性抗体具有同时结合 T 细胞和卵巢癌细胞并激活 T 细胞特异性杀伤卵巢癌细胞的功能, 可发展成为卵巢癌的生物治疗药物。

权 利 要 求 书

1. 一种抗卵巢癌的双特异性抗体，它是由抗卵巢癌的抗体，或其 Fab 片段、单
域抗体或单链抗体；和抗人 CD3 的抗体或其 Fab 片段、单域抗体或单链抗体连接而
5 成的。

2. 按照权利要求 1 所述的双特异性抗体，它是由抗卵巢癌的单链抗体，抗人
CD3 的单链抗体，且是经过人源化改造后的改形抗体连接而成的。

3. 按照权利要求 2 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的抗卵巢癌的单链
抗体具有如下的重链可变区氨基酸序列：

10

1 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu

11 Val Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile

15

21 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

31 Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met

41 Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Leu Gly Trp

20

51 Ile Asn Thr Asn Ser Glu Val Pro Lys Tyr

61 Ala Glu Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe

25

71 Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

81 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp

91 Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ala Arg Ser Phe

30

101 Thr Trp Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln

111 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

- 5 4. 按照权利要求 2 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的抗卵巢癌的单链抗体具有如下的轻链可变区氨基酸序列:

1 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser

10 11 Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser

21 Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val

31 His Ser Ile Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp

15

41 Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys

51 Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

20 61 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

71 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

81 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val

25

91 Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro

101 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

30 111 Leu Lys

5. 按照权利要求 2 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的抗人 CD3 的改形单链抗体具有如下的重链可变区氨基酸序列:

5 1 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu

 11 Val Arg Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val

 21 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
10
 31 Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala

 41 Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr

15 51 Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr

 61 Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met

 71 Thr Thr Asp Lys Ser Phe Ser Thr Ala Ile
20
 81 Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp

 91 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr

25 101 Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly

 111 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

6. 按照权利要求 2 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的抗人 CD3 的改形单链抗体具有如下的轻链可变区氨基酸序列:

30

1 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr
11 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
5
21 Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
31 Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
10
41 Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
51 Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
61 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
15
71 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
81 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
20
91 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
101 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

7. 按照权利要求 2 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 连接两个单链抗体的域
25 间连接肽具有如下的氨基酸序列:

1 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
11 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
30

21 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

8. 按照权利要求 2 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 连接两个单链抗体的域间连接肽具有如下的氨基酸序列:

5

1 Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

11 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr

10

21 Leu Val Glu Val Ser

9. 按照权利要求 2 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 连接两个单链抗体的域间连接肽具有如下的氨基酸序列:

15

1 Ala Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala

11 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp

21 Ala Lys Lys Asp Leu

20

10. 一种编码权利要求 1 至 9 中任何一项所述的双特异性抗体的核苷酸序列。

11. 一种含有权利要求 10 所述序列的表达载体。

12. 按照权利要求 11 所述的载体, 它是 pALM。

13. 按照权利要求 11 所述的载体, 它是 pET Δ E。

25

14. 按照权利要求 11 所述的载体, 它是 pTMF。

15. 一种含有权利要求 11 中所述的载体的宿主细胞。

16. 按照权利要求 15 所述的宿主细胞, 它是大肠杆菌。

17. 一种用于治疗或预防肿瘤的药物组合物, 包括权利要求 1-9 中任何一项所述的双特异性抗体和药用载体。

30

18. 权利要求 17 的药物组合物, 其中的肿瘤为卵巢癌。

19. 权利要求 1-9 中任何一项所述的双特异性抗体在制备用于治疗或预防肿瘤的
药物中的用途。

20. 权利要求 19 的用途，其中的肿瘤为卵巢癌。

21. 权利要求1-9中任何一项所述的双特异性抗体在治疗或预防肿瘤中的用途。

5 22. 权利要求 21 的用途，其中的肿瘤为卵巢癌。

1/13

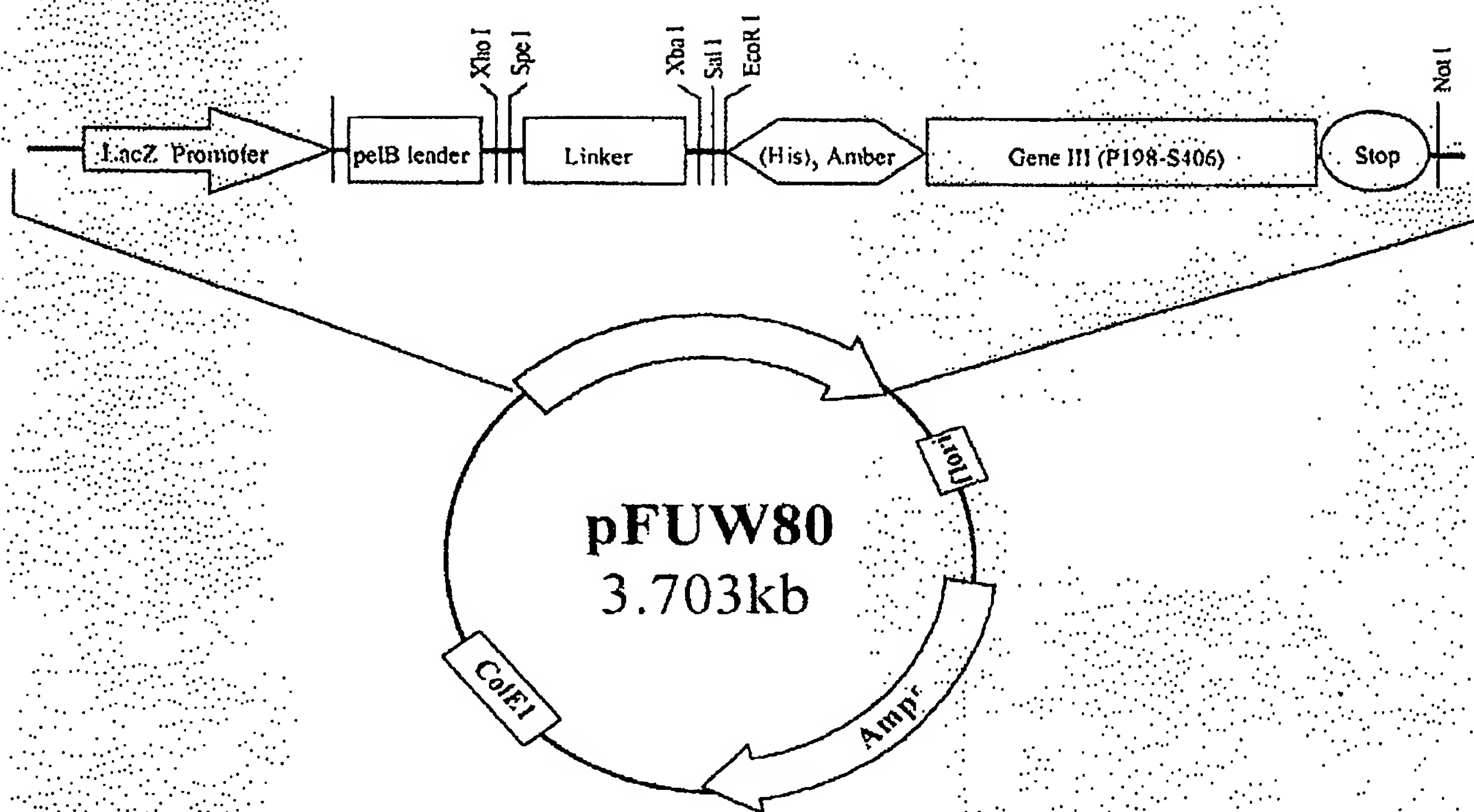


图1

2/13

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG GTG AAG AAG CCT GGA
Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
46 GAG ACA GTC AGG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA
Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu
91 ACT GCT GGA ATG CAG TGG GTG CAA AAG ATG CCA GGA AAG GGT TTG
Lys Trp Leu Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ser Glu Val Pro Lys Tyr
136 AAG TGG CTT GGC TGG ATA AAC ACC AAC TCT GAA GTT CCA AAA TAT
Ala Glu Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser
181 GCA GAA GAC TTC AGG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAG ACC TCT
Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp
226 GCC AGC ACT GCA TAT TTA CAG ATA AGC AAC CTC AAA AAT GAG GAC
Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ala Arg Ser Phe Thr Trp Gly Thr Met
271 ACG GCT ACG TTT TTC TGT GCG AGA TCT TTT ACT TGG GGG ACT ATG
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
316 GAC TAT TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

抗人卵巢癌VH核苷酸及氨基酸序列

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 GAT GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val
46 GGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG ACC CTT GTA
His Ser Ile Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
91 CAC AGT ATT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
136 GGC CAG TCT CCA AAA CTC CTG ATC TAC AAG GTT TCC AAC CGA TTT
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
181 TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
226 TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT
Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
271 TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCG TAC ACG TTC GGA GGG
Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
316 GGG ACC AAG CTG GAG CTC AAA

抗人卵巢癌VL核苷酸及氨基酸序列

图2

3/13

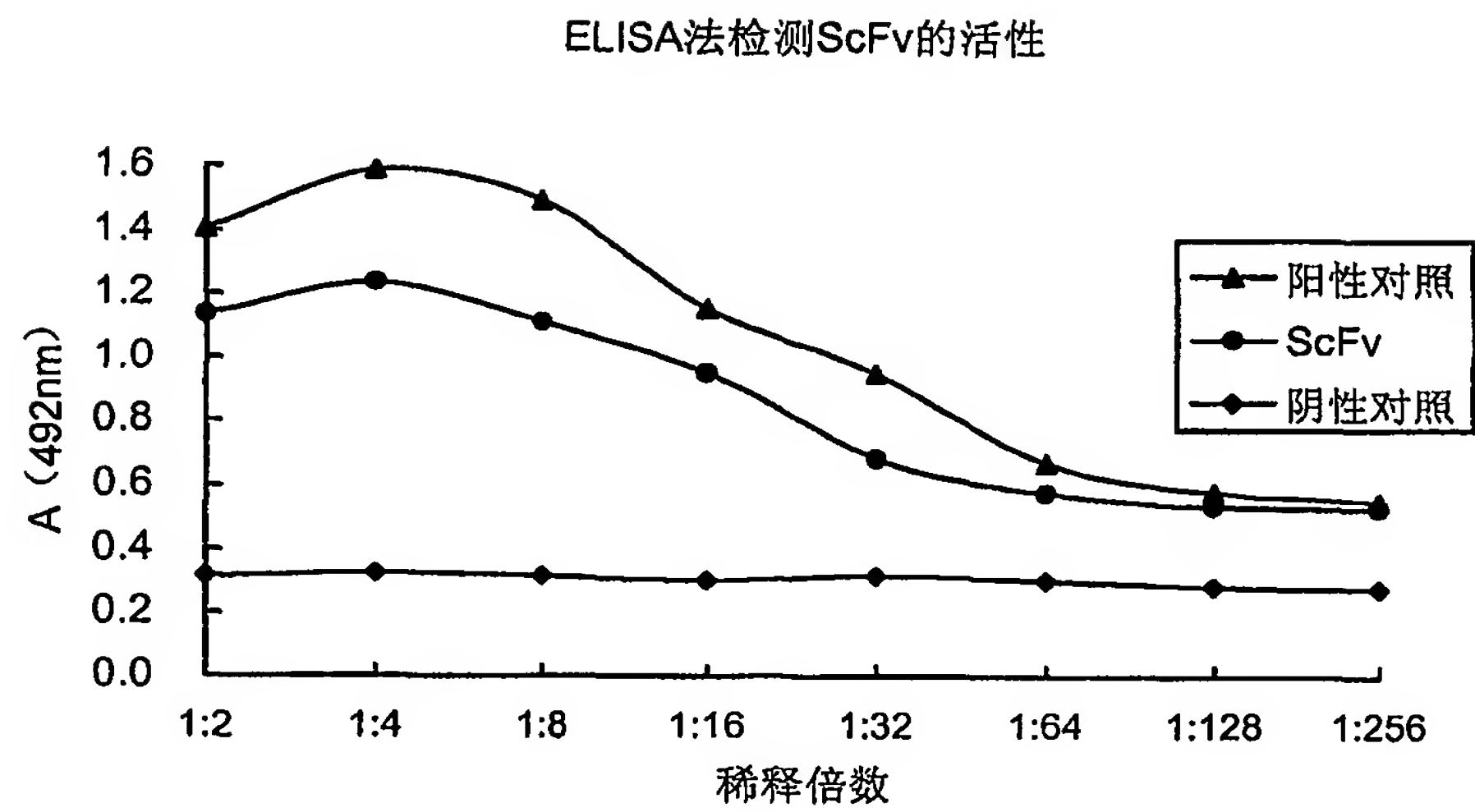


图3

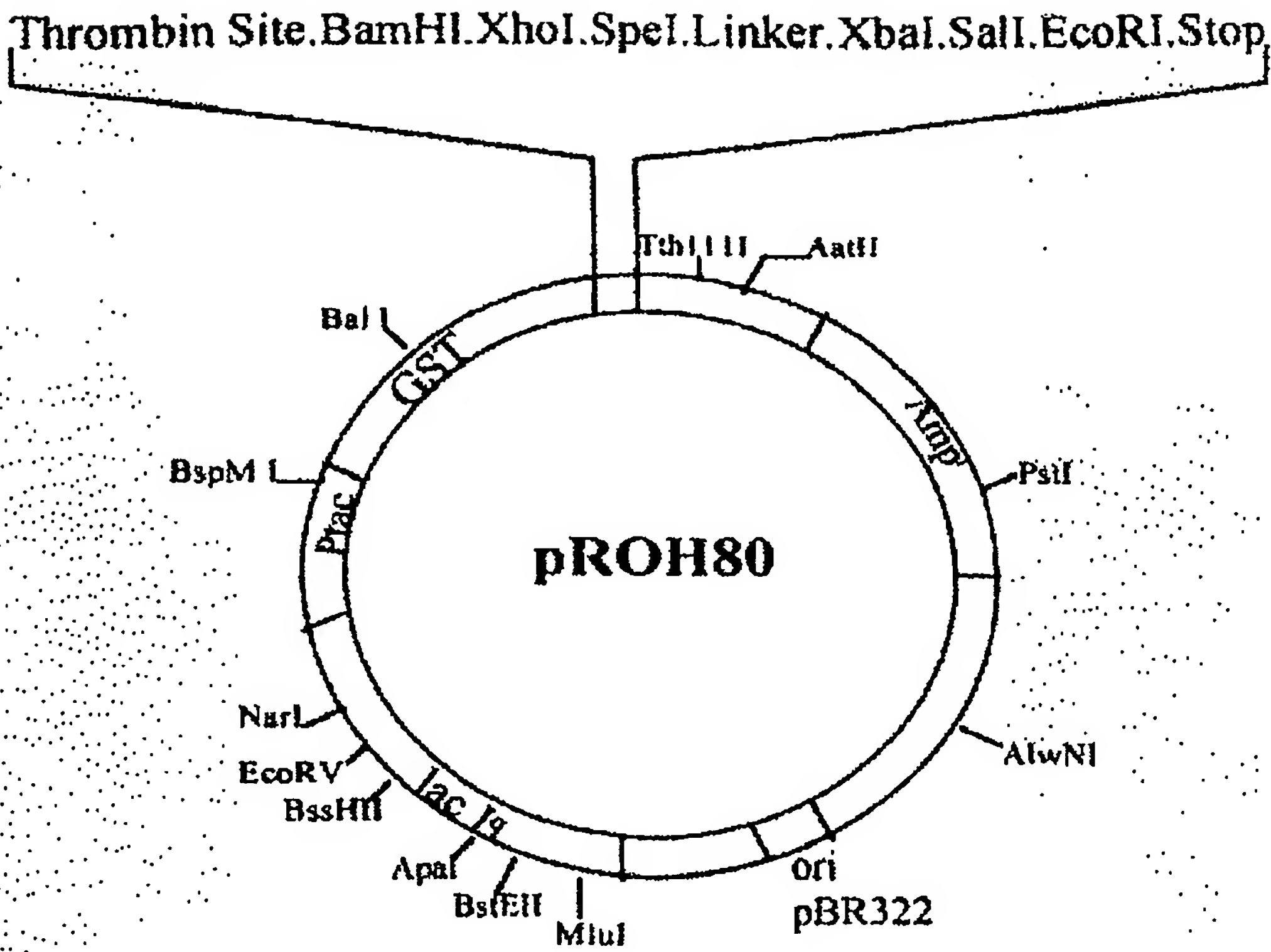


图4

5/13

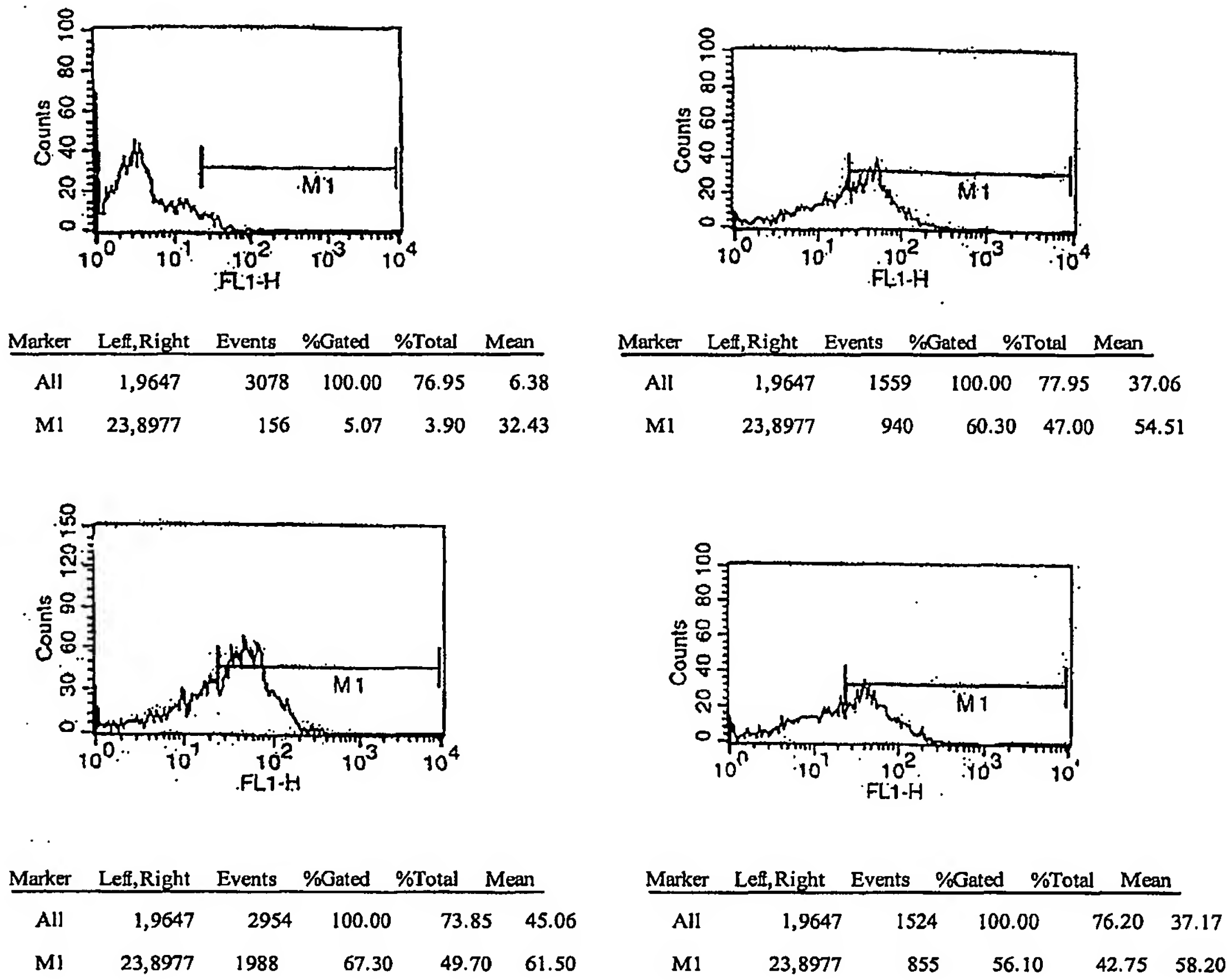
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly
1 CAG GTT CAG TTG GTG CAG TCT GGC GCT GAG GTG AGG AAG CCT GGG
Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
46 GCA TCA GTG AGG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACC
Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu
91 CGT TAC ACT ATG CAC TGG GTG CGT CAG GCC CCT GGG CAC GGG CTT
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
136 GAG TGG ATT GGA TAC ATT AAC CCT TCC AGA GGG TAC ACT AAC TAC
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Lys Ser
181 AAC CAA AAA TTC AAA GAT AGA GTG ACC ATG ACC ACT GAC AAA TCC
Phe Ser Thr Ala Ile Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
226 TTC AGT ACA GCC ATC ATG GAC CTG AGA AGT CTG AGA TCT GAC GAC
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
271 TCG GCC GTG TAC TAC TGT GCT AGA TAC TAC GAC GAC CAC TAC TGC
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
316 TTG GAT TAC TGG GGT CAA GGA ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

CD3改形VH核苷酸及氨基酸序列

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 GAG ATC GTA CTG ACC CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
46 GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC TCC GCA TCT TCC TCC GTT TCC
Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg
91 TAC ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGT CAA GCT CCT AGA AGA
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
136 TGG ATC TAT GAC ACC TCC AAA CTA GCA AGT GGT ATC CCA GCT AGG
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
181 TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGA ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGT
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
226 AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAT TAT TGT CAG CAA TGG
Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
271 TCT TCC AAC CCG TTC ACC TTC GGC GGA GGG ACT AAA GTG GAG ATC
Lys Arg
316 AAA CGA

CD3改形VH核苷酸及氨基酸序列

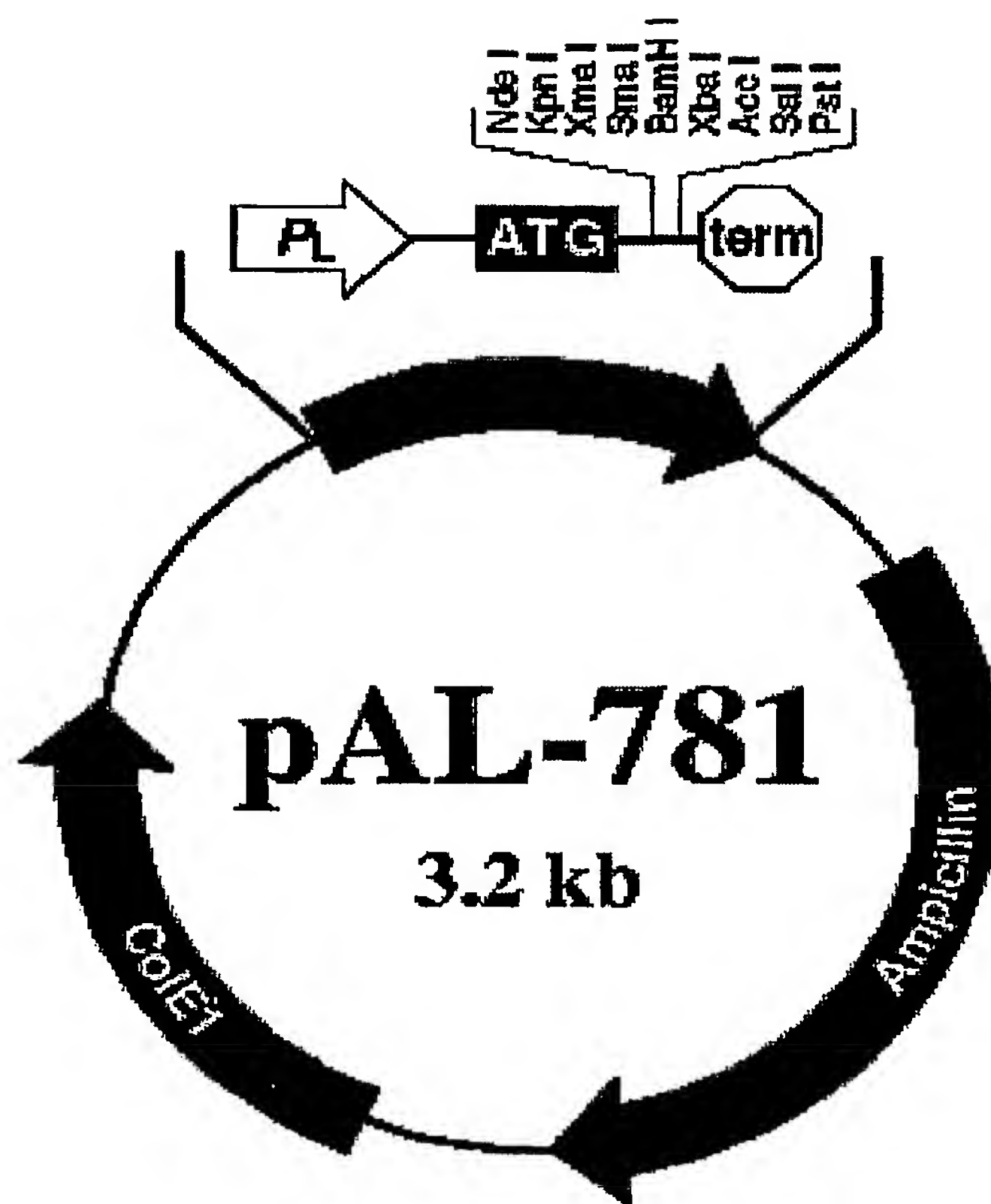
图5



上左：阴性对照 下左：阳性对照 上右：CD3改形ScFv复性样品
(0.35ug/ml) 下右： CD3 改形 ScFv 复性样品(0.70ug/ml)

图6

7/13



合成的多克隆位点序列如下：

MCS

NdeI *XhoI* *EcoRI* *SacI* *BamI* HisHisHisHisHisHis *PstI*
 5' TATGCTCGAGGAATTCGAGCTCACGGGATCCCATCACCATCACCATCACTAACTGCA3'
 ACGAGCTCCTTAAGCTCGAGTGCCCTAGGGTAGTGGTAGTGGTAGTGATTG

图7

Fc 域间连接肽:

	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
1	AAC	AGC	ACG	TAC	CGG	GTT	GTA	AGC	GTC	CTC
	TTG	TCG	TGC	ATG	GCC	CAA	CAT	TCG	CAG	GAG
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
31	ACC	GTA	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC
	TGG	CAT	GAC	GTG	GTC	CTG	ACC	GAC	TTA	CCG
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys				
61	AAG	GAA	TAC	AAA	TGC	AAG				
	TTC	CTT	ATG	TTT	ACG	TTC				

HSA 域间连接肽:

	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr
1	TTC	CAG	AAT	GCG	CTG	TTA	GTT	CGT	TAC	ACC
	AAG	GTC	TTA	CGC	GAC	AAT	CAA	GCA	ATG	TGG
	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr
31	AAG	AAA	GTA	CCC	CAA	GTG	TCA	ACT	CCA	ACT
	TTC	TTT	CAT	GGG	GTT	CAC	AGT	TGA	GGT	TGA
	Leu	Val	Glu	Val	Ser					
61	CTT	GTA	GAG	GTC	TCA					
	GAA	CAT	CTC	CAG	AGT					

205C' 域间连接肽:

	Ala	Ser	Ala	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Ala
1	GCT	AGC	GCA	GAC	GAT	GCC	AAA	AAA	GAT	GCA
	CGA	TCG	CGT	CTG	CTA	CGG	TTT	TTT	CTA	CGT
	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp
31	GCT	AAA	AAA	GAC	GAT	GCC	AAA	AAG	GAC	GAC
	CGA	TTT	TTT	CTG	CTA	CGG	TTT	TTC	CTG	CTG
	Ala	Lys	Lys	Asp	Leu					
61	GCC	AAA	AAA	GAT	CTG					
	CGG	TTT	TTT	CTA	GAC					

图8

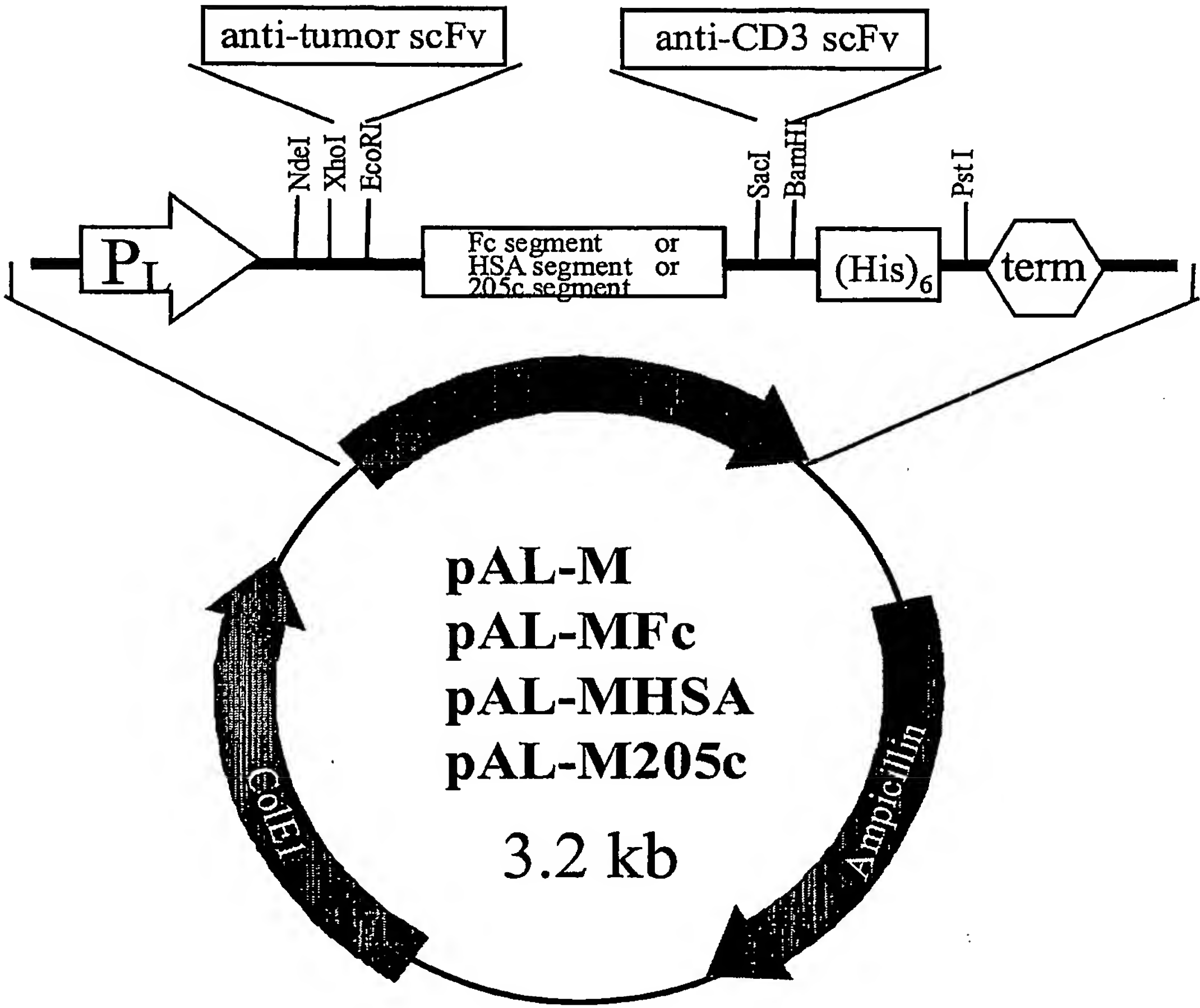


图9

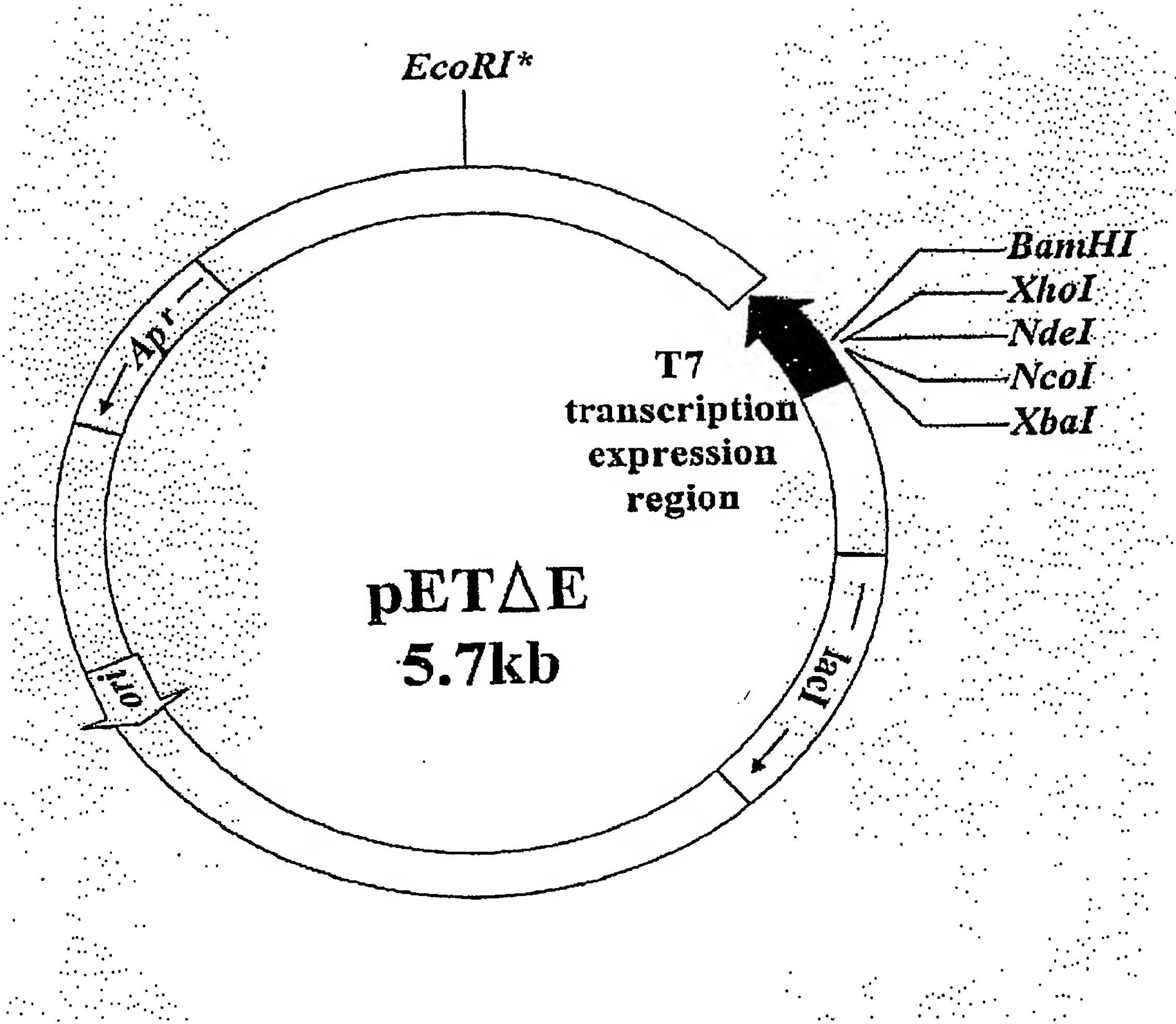


图10

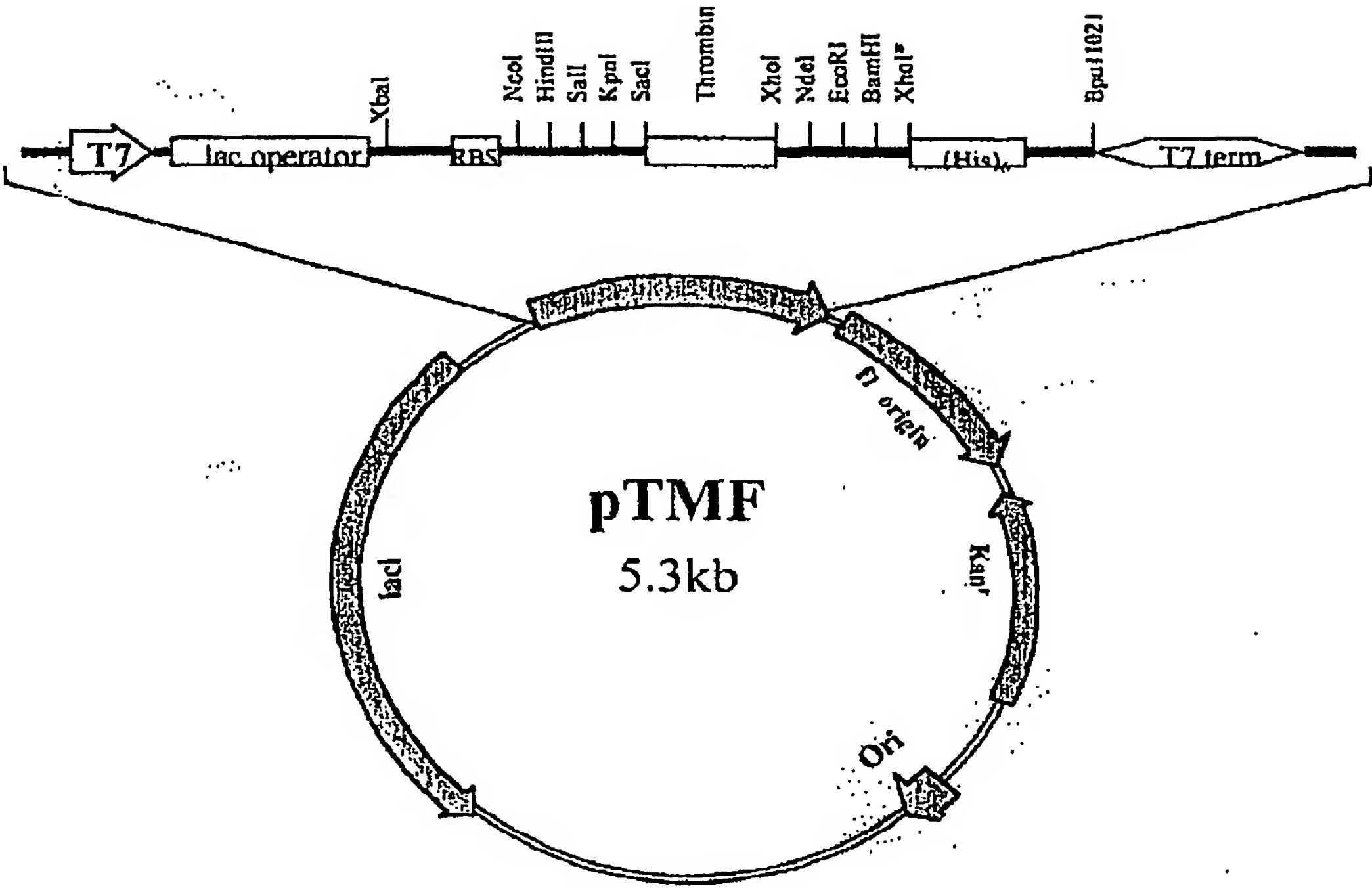


图11

12/13

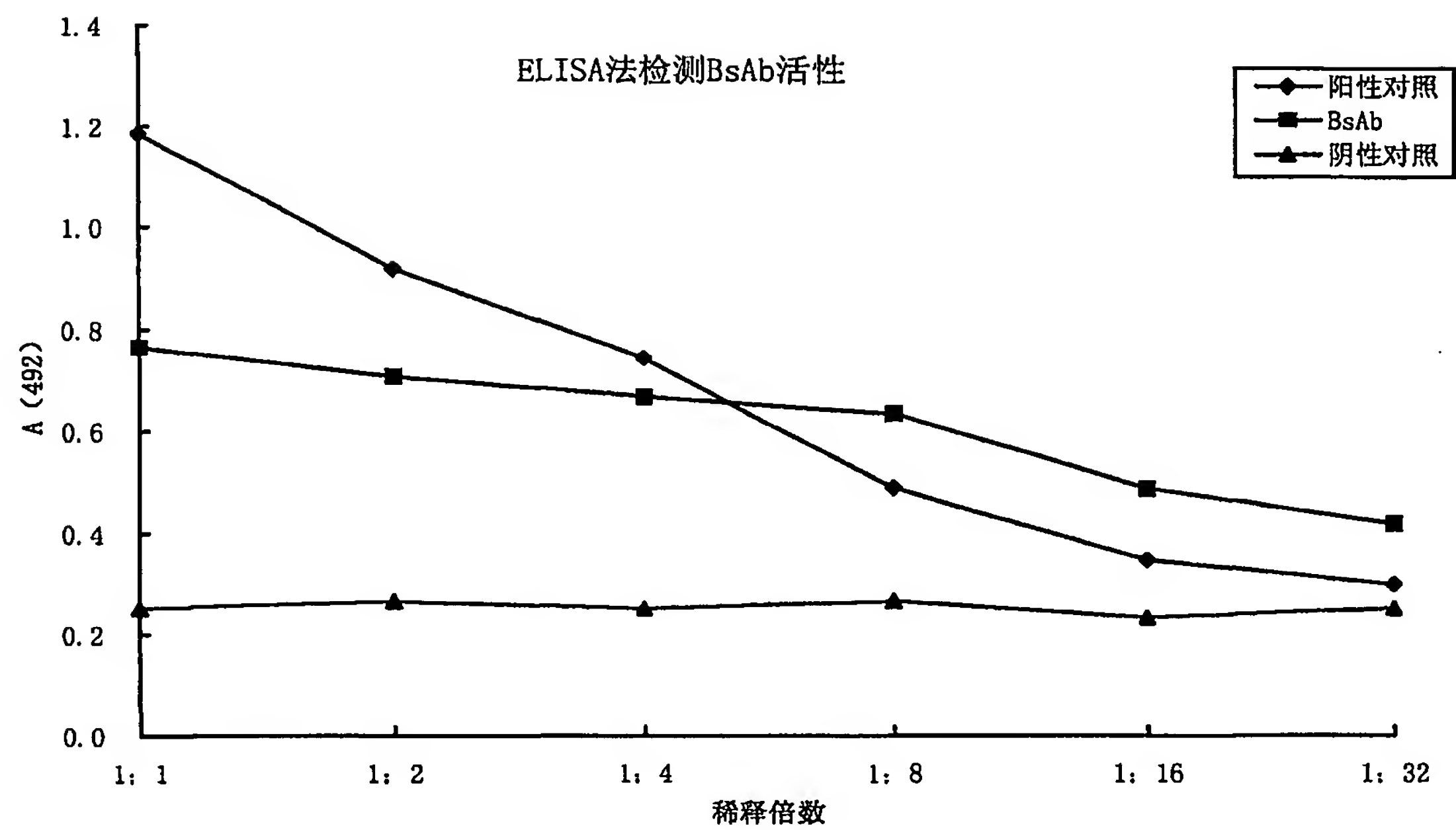


图12

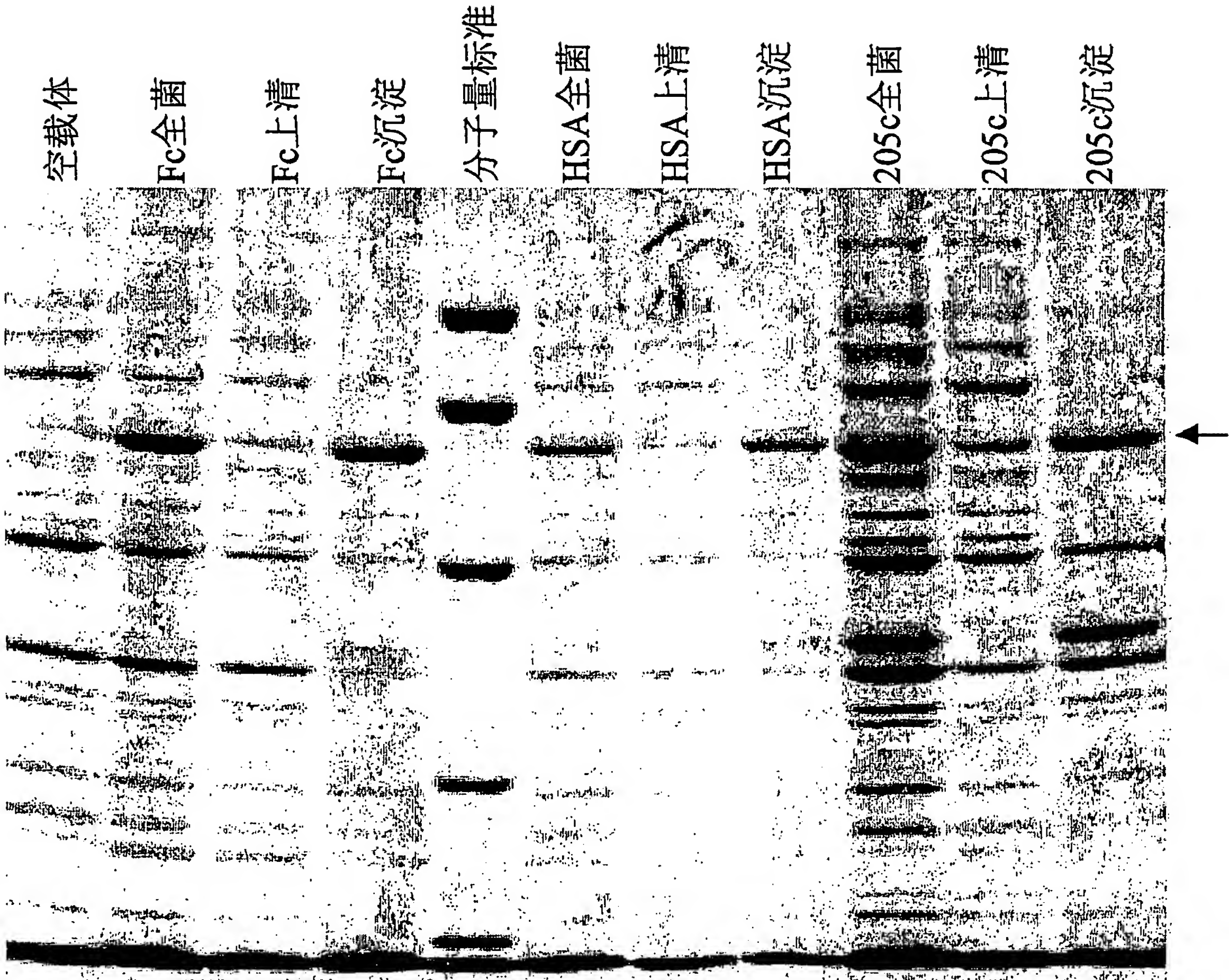


图13

序列表

<110> 中国科学院遗传与发育生物学研究所
北京安波特基因工程技术有限公司

<120> 抗人卵巢癌抗人CD3双特异性抗体

<130> IP02019

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<223>

<400> 1

gag	gtg	cag	ctg	cag	gag	tct	gga	cct	gag	gtg	aag	aag	cct	gga	gag		48
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu		
1				5				10						15			

aca	gtc	agg	atc	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggg	tat	acc	ttc	aca	act	gct		96
Thr	Val	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Ala		
			20					25					30				

gga	atg	cag	tgg	gtg	caa	aag	atg	cca	gga	aag	ggt	ttg	aag	tgg	ctt		144
Gly	Met	Gln	Trp	Val	Gln	Lys	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Leu		
		35					40					45					

ggc	tgg	ata	aac	acc	aac	tct	gaa	gtt	cca	aaa	tat	gca	gaa	gac	ttc		192
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Asn	Ser	Glu	Val	Pro	Lys	Tyr	Ala	Glu	Asp	Phe		
	50					55					60						

agg	gga	cgg	ttt	gcc	ttc	tct	ttg	gag	acc	tct	gcc	agc	act	gca	tat		240
Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65				70						75				80			

tta	cag	ata	agc	aac	ctc	aaa	aat	gag	gac	acg	gct	acg	ttt	ttc	tgt		288
Leu	Gln	Ile	Ser	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Phe	Phe	Cys		
				85				90						95			

gcg aga tct ttt act tgg ggg act atg gac tat tgg ggg caa ggg acc 336
 Ala Arg Ser Phe Thr Trp Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

acg gtc acc gtc tcc tca 354
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Leu
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ser Glu Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Phe Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Trp Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (336)
 <223>

<400> 3

gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga	48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag acc ctt gta cac agt	96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val His Ser	
20 25 30	

att gga aac acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct	144
Ile Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	

cca aaa ctc ctg atc tac aag gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca	192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
50 55 60	

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser	
85 90 95	

aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ctc aaa	336
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
100 105 110	

<210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val His Ser
 20 25 30

Ile Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 5
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (357)
 <223>

<400> 5
 cag gtt cag ttg gtg cag tct ggc gct gag gtg agg aag cct ggg gca 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg agg gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc cgt tac 96
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

act atg cac tgg gtg cgt cag gcc cct ggg cac ggg ctt gag tgg att 144
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga tac att aac cct tcc aga ggg tac act aac tac aac caa aaa ttc 192
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

aaa gat aga gtg acc atg acc act gac aaa tcc ttc agt aca gcc atc 240
Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Lys Ser Phe Ser Thr Ala Ile
65 70 75 80

atg gac ctg aga agt ctg aga tct gac gac tcg gcc gtg tac tac tgt 288
Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gct aga tac tac gac gac cac tac tgc ttg gat tac tgg ggt caa gga 336
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc acg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210>	6
<211>	119
<212>	PRT
<213>	Artificial

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 . 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Lys Ser Phe Ser Thr Ala Ile
65 70 75 80

Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (321)
 <223>

<400> 7
 gag atc gta ctg acc cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc tcc gca tct tcc tcc gtt tcc tac atg 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

 aac tgg tac caa cag aaa cct ggt caa gct cct aga aga tgg atc tat 144
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

 gac acc tcc aaa cta gca agt ggt atc cca gct agg ttc agt ggc agt 192
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

 gga tca gga aca gat ttc act ctc acc atc agt agc cta gag cct gaa 240
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

 gat ttt gcg act tat tat tgt cag caa tgg tct tcc aac ccg ttc acc 288
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 85 90 95

 ttc ggc gga ggg act aaa gtg gag atc aaa cga 321

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 9
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (78)
<223>

<400> 9

aac	agc	acg	tac	cgg	gtt	gta	agc	gtc	ctc	acc	gta	ctg	cac	cag	gac		48
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
1				5				10						15			

tgg	ctg	aat	ggc	aag	gaa	tac	aaa	tgc	aag								78
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys								
			20					25									

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 10

Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
1				5				10						15		

Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys							
			20					25								

<210> 11

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (75)

<223>

<400> 11

ttc	cag	aat	gcg	ctg	tta	gtt	cgt	tac	acc	aag	aaa	gta	ccc	caa	gtg		48
Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val		
1				5				10						15			

tca	act	cca	act	ctt	gta	gag	gtc	tca									75
Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser									
			20					25									

<210> 12

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 12

Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val
1				5					10					15	

Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser
			20					25

<210> 13

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (75)

<223>

<400> 13

gct	agc	gca	gac	gat	gcc	aaa	aaa	gat	gca	gct	aaa	aaa	gac	gat	gcc	48
Ala	Ser	Ala	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	
1				5					10					15		

aaa	aag	gac	gac	gcc	aaa	aaa	gat	ctg								75
Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Leu								
			20					25								

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 14

Ala	Ser	Ala	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Ala
1				5					10					15	

Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Leu
			20					25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00347

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N15/13, 15/62, C12P21/08

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12N15/13, 15/62, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, EPOQUE(WPI), NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	WO,A2, 9316185, ((CREATIVE BIOMOLECULES, INC.), 19, August, 1993, see the entire document.	1
A		2-22
A	US, A, 6146628, ((MINU) UNIV MINNESOTA& RUTGERS et al), 14, November, 2000, see the abstract.	1-22
A	US,A, 6027725, ((ENZO-N) ENZON INC), 22, February, 2000, see the abstract.	1-22
A	EP, A1, 0505908, ((HOFF) HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F), 30, September,1992, see the abstract.	1-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A"document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"earlier document but published on or after the international filing date

"L"document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O"document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 August 2002(20.08.2002)

Date of mailing of the international search report

14 NOV 2002 (14.11.02)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

WEI, Chunbao

Telephone No. 86-10-62093435

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN02/00347

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A2-9316185	19-08-1993	AU-A- 3612293 EP-A1- 0625200 JP-T-8500962T US-A- 5877305	03-09-1993 23-11-1994 06-02-1996 02-03-1999
US-A-6146628	14-11-2000	NONE	
US-A-6027725	22-02-2000	NONE	
EP-A1-0505908	30-09-1992	CA-A-2063035 JP-A-5219960 AU-A-1314492 ZA-A-9202067 NZ-A-242056	28-09-1992 31-08-1993 05-08-1993 25-11-1992 27-04-1994

A. 主题的分类

IPC⁷ C12N15/13, 15/62, C12P21/08

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C12N15/13, 15/62, C12P21/08

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

EPOQUE(WPI), CNPAT, NCBI

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	WO,A2, 9316185, ((CREATIVE BIOMOLECULES, INC.), 19, 8 月, 1993, 见全文.	1
A		2—22
A	US, A, 6146628, ((MINU) UNIV MINNESOTA & RUTGERS 等), 14, 11 月, 2000, 见摘要.	1—22
A	US,A, 6027725,((ENZO-N) ENZON INC),22,2 月,2000,见摘要.	1—22
A	EP, A1, 0505908, ((HOFF) HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F), 30, 09, 1992, 见摘要	1—22

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

20 08 月 2002(20.08.2002)

国际检索报告邮寄日期

14. 11 月 2002(14. 11. 02)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-10-62019451

授权官员

魏春

电话号码: 86-10-62093435

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN02/00347

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO-A2-9316185	19-08-1993	AU-A- 3612293 EP-A1- 0625200 JP-T-8500962T US-A- 5877305	03-09-1993 23-11-1994 06-02-1996 02-03-1999
US-A-6146628	14-11-2000	无	
US-A-6027725	22-02-2000	无	
EP-A1-0505908	30-09-1992	CA-A-2063035 JP-A-5219960 AU-A-1314492 ZA-A-9202067 NZ-A-242056	28-09-1992 31-08-1993 05-08-1993 25-11-1992 27-04-1994